

細胞の動的・高次構造体  
2021年度採択研究者

2021年度 年次報告書
-----------------

李 勇燦

横浜市立大学大学院生命医科学研究科  
助教

物質吸収を担う刷子縁膜の高次構造動態とその破綻メカニズムの解明

## § 1. 研究成果の概要

本研究の最終目標は、電子顕微鏡によるクライオトモグラフィー法 (Cryo-ET) を用いて、刷子縁膜内部の構造体を高分解能で可視化することである。2021 年度は、細胞培養法の検討、試料調製法の初期検討、および機器の操作習熟に当てた。また抗体を用いたラベリングに向けて、各標的タンパク質の精製を開始した。

細胞培養系の構築に向けては、まず Caco-2 上皮細胞培養系を立ち上げた。ガラスボトムディッシュと市販の金グリッドの組み合わせにより、グリッド上に細胞シートが形成されることが確認できた。また、金グリッドにカーボン膜を蒸着することでグリッドの自作も試みた。

集束イオンビームを用いた試料加工に関しては、理化学研究所に設置された FIB-SEM 装置 Aquilos2 の試運転およびデモを行い、機器習熟のためのトレーニングを開始した。複数の細胞種をテスト試料とし、電流設定や切削スキームを細かく検討した。さらに、これらの試料および単粒子解析用の試料を電子顕微鏡 Titan Krios G4 に装填し、傾斜シリーズの撮影を行った。

サブトモグラム再構成のテストケースとして、精製リボソームを用いた撮影データから、計算ワークフローの構築も行った。まずは、ワーキングステーションに IMOD に代表される一連のプログラムをインストールし、データ前処理から本処理の流れを構築した。次に、傾斜シリーズのトラッキングからトモグラム再構築を手動、自動で行うための環境を構築した。これらのデータを、RELION 4 ベータ版に入力し、一連の解析を経て、0.5 nm を切る分解能でのマップ再構成に成功した。

抗体を用いたラベリング、ならびに三次元モデルの取得を目的として、刷子縁膜に局在する膜輸送体や膜酵素のクローニングを行った。また、微生物感染による形態変化を可視化するため、感染者側の標的タンパク質のクローニングも行った。